

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

932.1205

**UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Re: Application of: Pedro ORTIZ ARMUA  
Serial No.: Not yet known  
Filed: Herewith  
For: A RADIOLABELED MAMMALIAN  
TACHYKININ PEPTIDE ANALOGUE

**LETTER RE PRIORITY**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231-9998

January 3, 2002

Dear Sir:

Applicant hereby claims the priority of Spanish Patent Application No P-9901489 filed July 5, 1999 through International Patent Application No. PCT/IB00/01260 filed July 5, 2000.

Respectfully submitted,

By: \_\_\_\_\_



Paul J. Higgins  
Reg. No. 44,152

Steinberg & Raskin, P.C.  
1140 Avenue of the Americas, 15th Floor  
New York, NY 10036-5803  
Telephone: (212) 768-3800  
Facsimile: (212) 382-2124  
E-mail: sr@steinberggraskin.com

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11/01

**OFICINA ESPAÑOLA**

de

REC'D 25 OCT 2000	
WIPO	PCT

**PATENTES y MARCAS**

IB<sup>00</sup> / 01260

10/030388

# CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 9901489 , que tiene fecha de presentación en este Organismo el 5 de Julio de 1999.

Madrid, 9 de octubre de 2000

El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica.

P.D.

M. MADRUGA

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y  
MARCAS

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

NUMERO DE SOLICITUD

P 9901439  
FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN O.E.P.M.  
99 JUL -5 13:19

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO OEPM

(1) <input type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA		(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD		(3) LUGAR DE PRESENTACION CODIGO MADRID	
(4) SOLICITANTES(S)		APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA		NOMBRE DNI	
ORTIZ ARMUA				PEDRO	
(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE					
DOMICILIO Dr. Severo Ochoa n° 37-41					
LOCALIDAD ALCOBENDAS					
PROVINCIA MADRID					
PAIS RESIDENCIA ESPAÑA					
NACIONALIDAD Española					
TELEFONO					
CODIGO POSTAL 28100					
CODIGO PAIS ES					
CODIGO NACION ES					
(6) INVENTORES		(7) <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO EL INVENTOR O UNICO INVENTOR		(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO	
APELLIDOS		NOMBRE		NACIONALIDAD COD. NACION	
(9) TITULO DE LA INVENCION					
"UN ANALOGO DEL PEPTIDO TAQUIQUININA DE MAMIFERO MARCADO RADIATIVAMENTE"					
(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P. <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO					
(11) EXPOSICIONES OFICIALES					
LUGAR FECHA					
(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD					
PAIS DE ORIGEN		COD. PAIS	NUMERO	FECHA	
(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P. <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO					
(14) REPRESENTANTE		APELLIDOS		NOMBRE CODIGO	
DOMICILIO		ISERN JARA		NURIA 376/x	
C/ ORENSE, N° 64		LOCALIDAD		PROVINCIA COD. POSTAL	
		MADRID		MADRID 28020	
(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN				FIRMA DEL FUNCIONARIO	
<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCION. N° DE PAGINAS..... 15 <input checked="" type="checkbox"/> REIVINDICACIONES. N° DE PAGINAS. 4 <input type="checkbox"/> DIBUJOS. N° DE PAGINAS..... <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD				<input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACION <input type="checkbox"/> PRUEBAS <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS <input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS <input type="checkbox"/> OTROS	
(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION				FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE	
Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.					

1. O.E.P.M. Expediente

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

UNE A-4 MOD. 3101i



# PATENTE

## RESUMEN Y GRAFICO

NUMERO DE SOLICITUD

P9901489

FECHA DE PRESENTACION

RESUMEN. (Máx. 150 palabras)

Un análogo de péptido taquiquinina de mamífero marcado radiactivamente; el uso del análogo para la obtención de imágenes in vivo del receptor del péptido taquinina; y un kit de diagnóstico que comprende el análogo.

GRAFICO



ESPAÑOLA DE PATENTES

OFICINA



Y MARCAS

DATOS DE PRIORIDAD

(3) NUMERO

(32) FECHA

(33) PAIS

A1

(12) PATENTE DE INVENCION

(21) NUMERO DE SOLICITUD

(22) FECHA DE PRESENTACION

P 9 6 0 1 4 3 9

(71) SOLICITANTE (S)

ORTIZ ARMUA

PEDRO

NACIONALIDAD

Española

DOMICILIO Dr. Severo Ochoa n° 37-41

ALCOBENDAS

28100

MADRID

(72) INVENTOR (ES)

El mismo solicitante

(73) TITULAR (ES)

(11) N.º DE PUBLICACION

(45) FECHA DE PUBLICACION

(62) PATENTE DE LA QUE ES  
DIVISIONARIA

GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(51) Int. Cl.

(54) TITULO

"UN ANALOGO DEL PEPTIDO TAQUIQUININA DE MAMIFERO  
MARCADO RADIATIVAMENTE"

(57) RESUMEN (APORTACION VOLUNTARIA, SIN VALOR JURIDICO)

Un análogo de péptido taquiquinina de mamífero marcado radiactivamente; el uso del análogo para la obtención de imágenes in vivo del receptor del - péptido taquininina; y un kit de diagnóstico que comprende el análogo.

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a un análogo del péptido taquiquinina de mamífero marcado radiactivamente; al uso del análogo para la obtención de imágenes del receptor del péptido taquiquinina de mamífero *in vivo*; y a un kit de diagnóstico que comprende el análogo.

### Descripción del conocimiento anterior en el campo

Las taquiquininas son una familia de péptidos que comparten una secuencia aminoacídica común en el extremo C terminal, -Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, donde X representa Phe, Ile o Val.

Las taquiquininas de mamífero incluyen la sustancia (SP), neuroquininas A y B y dos formas extendidas en el terminal de neuroquinina A, esto es, el neuropéptido K y el neuropéptido Y. La nomenclatura aceptada actualmente del receptor de taquiquinina define tres tipos de receptores homólogos: (a) el receptor de neuroquinina 1, que prefiere la sustancia P, (b) el receptor de neuroquinina 2, que prefiere la neuroquinina A, y (c) el receptor de neuroquinina 3, que prefiere la neuroquinina B.

Los receptores de taquiquinina tienen una amplia distribución tisular, y la interacción con sus ligandos está asociada con diversos tipos de respuesta, tales como respuestas inmunológicas, liberación de histamina, inflamación, regeneración de nervios y cicatrización de heridas (P.M. van Hagen, "Somatostatin and Substance P analogues: Applications on autoimmune and haematological diseases", Thesis Erasmus, Universidad de Rotterdam (1995), Capítulo

8.1; Breeman y cols., J. of Nuclear Medicine 37: 108-117 (1996)).

La obtención de imágenes de receptores in vivo empleando un péptido marcado con isótopos radiactivos es conocida en el campo.

Breeman y cols., J. of Nuclear Medicine 37: 108-117 (1996); y Hagen y cols., European J. of Medicine, 23: 1508-1513 (1996) describen un SP marcado con  $^{111}\text{In}$ , así como su uso para la obtención de imágenes del receptor SP.

10 Hennig y cols., Int. J. Cancer 61: 786-792 (1992); y Walsh y cols., Annals of the Rheumatic Diseases 51: 313-317 (1992) describen un péptido SP marcado con  $^{125}\text{I}$ , así como su uso para la obtención de imágenes del receptor SP.

15 Hagen y cols., declaran en el resumen que "La degradación de  $^{111}\text{In}$  - SP se inició en los primeros minutos tras la administración, lo que tuvo como resultado una **semivida de 10 min...**".

A continuación afirman "Concluimos que, **a pesar de la semivida corta**,  $^{111}\text{In}$  - SP ... puede ser utilizado para visualizar el timo".

#### Resumen de la invención

25 El problema que pretende resolver la presente invención es proporcionar un análogo de péptido taquiquinina de mamífero marcado radiactivamente que tenga una semivida in vivo relativamente larga.

La solución es un análogo de péptido taquiquinina de mamífero marcado radiactivamente que contiene un péptido taquiquinina marcado con un isótopo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (péptido taquiqui-

nina -  $^{99m}\text{Tc}$ ), que tiene una semivida in vivo de al menos 30 minutos, preferentemente una semivida in vivo de al menos una hora, más preferentemente una semivida in vivo de al menos 3 horas, y con la mayor preferencia una semivida in vivo de al menos 5 horas.

Una ventaja de un análogo de péptido taquiquinina tal y como se describe aquí es que la relativamente larga semivida facilitará su uso por ejemplo en la obtención de imágenes del receptor in vivo.

10 Una ventaja adicional es que forma menos agregados en comparación con análogos de taquiquinina marcados radiactivamente conocidos previamente en el campo.

Tal y como se declara anteriormente, es conocida en el campo la obtención de imágenes de receptores in vivo empleando un péptido taquiquinina marcado radiactivamente con un radioisótopo  $^{111}\text{In}$  o  $^{125}\text{I}$  (Breeman y cols., J. of Nuclear Medicine 37: 108-117 (1996); Hagen y cols., European J. of Medicine, 23: 1508-1513 (1996); Hennig y cols., Int. J. Cancer 61: 786-792 (1992); y Walsh y cols., Annals of the Rheumatic Diseases 51: 313-317 (1992)).

20 Un análogo de taquiquinina tal como se describe aquí puede ser utilizado en un modo similar tal y como por ejemplo se describe en las referencias mencionadas anteriormente. Adicionalmente, la semivida mejorada facilitará su uso en relación con la obtención de imágenes de receptores.

En este sentido, la presente invención se refiere en un segundo aspecto al uso de análogos de taquiquinina marcados radiactivamente como se describe aquí para la obten-

ción de imágenes del receptor de péptido taquiquinina de mamífero in vivo.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico que comprende un análogo de taquiquinina marcado radiactivamente como se describe aquí que es adecuado para ser utilizado en cualquiera de los usos de los análogos de taquiquinina marcados radiactivamente como se describen aquí.

La preparación de dicho kit de diagnóstico que tiene ingredientes extra especialmente adecuados está al alcance de las personas expertas con un conocimiento general.

#### Definiciones

Se presenta a continuación una definición de los términos específicos relacionados con los principales aspectos de la invención.

El término "péptido taquiquinina" es un término conocido habitualmente en el campo en referencia a una familia de péptidos. Ver arriba, y por ejemplo Breeman y cols., J. of Nuclear Medicine 37: 108-117 (1996). Estos péptidos están bien definidos incluso al nivel de secuencia aminoacídica (ver a continuación) y se caracterizan por su unión específica a receptores de mamíferos importantes (ver anteriormente). El término "péptido taquiquinina" significa aquí estos péptidos bien conocidos en su forma natural, esto es, con sus secuencias aminoacídicas naturales. Sin embargo, es bien conocido en el campo que una secuencia polipeptídica puede ser modificada en el sentido de un cambio en la secuencia aminoacídica sin que ello suponga un

cambio significativo en sus características esenciales. Una característica esencial del péptido taquiquinina tal y como se describe aquí es su afinidad de unión por el receptor que tiene el péptido taquiquinina específico como su sustrato / ligando preferido. Tal y como se ha descrito anteriormente (a) el receptor 1 de neuroquinina tiene la sustancia P como sustrato preferido, (b) el receptor 2 de neuroquinina tiene la neuroquinina A como sustrato preferido, y (c) el receptor de neuroquinina 3 tiene la neuroquinina B como sustrato preferido. En este sentido, además de significar los péptidos de taquiquinina bien conocidos en su forma natural, el alcance del término "péptido taquiquinina" incluye también una variante con un cambio aminoacídico de estos péptidos que ha mantenido esencialmente la misma afinidad de unión por el receptor. Como ilustración, el péptido taquiquinina sustancia P (SP) es el sustrato preferido para el receptor de neuroquinina 1. La SP tiene una afinidad de unión de  $K_d = 0,5 - 1,0$  nM para este receptor (ver P.M. van Hagen, "Somatostatin and Substance P analogues: Applications on autoimmune and haematological diseases", Thesis Erasmus, Universidad de Rotterdam (1995), Capítulo 7; sección "Substance P"). En consecuencia, una variante de SP que ha mantenido esencialmente la misma capacidad de unión para el receptor neuroquinina 1 entra dentro del ámbito del término "péptido taquiquinina" tal y como aquí se describe.

El término "<sup>99m</sup>Tc" significa el isótopo <sup>99m</sup>Tecnecio (Molinsky V.J., Int. J. Appl. Radiat. Isot. 33: 811-819

(1982)). La nomenclatura " $^{99m}\text{Tc}$ " y " $\text{Tc-}^{99m}$ " puede usarse aquí de forma intercambiable.

La medición del término "semivida" se determina de acuerdo con los ensayos estándar en un ser humano. Prefe-  
5 rentemente, el ensayo determina el curso temporal de la radiactividad total ( $^{99m}\text{Tc}$  +  $^{99m}\text{Tc}$  - péptido taquiquinina) y unida a péptido ( $^{99m}\text{Tc}$  - péptido taquiquinina) en plasma sanguíneo humano en momentos de tiempo seleccionados de hasta 50 horas. En base a esto se calcula la semivida. En-  
10 tra dentro de los conocimientos generales de las personas expertas el identificar una estrategia adecuada para separar el radioisótopo no unido a péptido " $^{99m}\text{Tc}$ " y el radioisótopo unido a péptido " $^{99m}\text{Tc}$  - péptido taquiquinina" en plasma sanguíneo. Se describe a continuación un ejemplo de  
15 una estrategia adecuada.

La radiactividad en plasma sanguíneo se mide con un sistema LKB-1282-Compugamma o un Geli-detector equipado con un analizador multicanal (Serie 40, Canberra). La sangre se  
recoge en tubos conteniendo EDTA e inmediatamente se enfría  
20 en hielo, y las muestras se centrifugan inmediatamente a  $0^{\circ}\text{C}$ , separándose el plasma en columnas SEP-PAK  $\text{C}_{18}$ . Empleando la técnica de separación descrita en Breeman y cols., Eur. J. Nucl. Med. 21: 328-335 (1994), el  $^{99m}\text{Tc}$  - péptido taquiquinina se une a la fase estacionaria de SEP-PAK  $\text{C}_{18}$  y  
25 se eluye únicamente con etanol, mientras que el  $^{99m}\text{Tc}$  libre no queda retenido en las columnas SEP-PAK  $\text{C}_{18}$ . La radiactividad en plasma, que se eluye con etanol de las columnas SEP-PAK  $\text{C}_{18}$ , se denomina radiactividad unida a péptido. La

cantidad total de radiactividad es la suma de la radiactividad unida a péptido y la radiactividad libre debida a  $^{99m}\text{Tc}$ . Se recogen muestras de sangre directamente 2, 5, 10, 20 y 40 min, 1, 4, 10, 20 y 50 horas después de la infusión.

Las realizaciones de la presente invención se describen a continuación, meramente como ejemplos.

Descripción detallada de la invención

Análogo de taquiquinina marcado radiactivamente

Una realización de la invención se refiere a un análogo de péptido taquiquinina, en el que el péptido taquiquinina se selecciona del grupo consistente en: un péptido neuroquinina A; un péptido neuroquinina B; un neuropéptido K (extendido en el extremo N terminal a partir de neuroquinina A); un neuropéptido Y (extendido en el extremo N terminal a partir de neuroquinina A); y preferentemente un péptido sustancia P (SP).

El ejemplo 2 (ver más adelante) muestra que un análogo de  $^{99m}\text{Tc}$  - péptido SP es capaz de unirse específicamente a las glándulas salivares de un ratón en un 0,62% de la dosis inyectada por gramo de órgano (% ID/g).

En este sentido, una realización se refiere a un análogo del péptido taquiquinina, tal y como aquí se describe, en el que el análogo es capaz de unirse específicamente a las glándulas salivares de un ratón en al menos un 0,35% de la dosis inyectada por gramo de órgano (%ID/g); preferentemente en el que el análogo es capaz de unirse específicamente a las glándulas salivares de un ratón en al menos un



0,45% de la dosis inyectada por gramo de órgano (%ID/g); más preferentemente en el que el análogo es capaz de unirse específicamente a las glándulas salivares de un ratón en al menos un 0,55% de la dosis inyectada por gramo de órgano (%ID/g), expresado como la diferencia de captación tisular (captación de 90 minutos) entre ratones no tratados y ratones tratados con 90 nmol de un péptido taquiquinina no radiactivo.

En relación con esta unión específica en las glándulas salivares el péptido taquiquinina es preferentemente un péptido sustancia P (SP).

Tal y como se ha descrito anteriormente, un péptido taquiquinina puede ser descrito por una secuencia C-terminal común.

En este sentido, una realización de la invención se refiere a un análogo de péptido taquiquinina tal y como se ha descrito aquí, en el que el péptido taquiquinina comprende la secuencia aminoacídica C-terminal, -Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, donde X representa Phe, Ile o Val.

La forma natural del péptido sustancia P (SP) muestra la secuencia aminoacídica Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (Breeman y cols., J. of Nuclear Medicine, 37: 108-117 (1996)).

Una realización por consiguiente se refiere a un análogo de péptido taquiquinina como se ha descrito aquí en el que el péptido taquiquinina es un péptido sustancia P (SP) que consiste esencialmente en la secuencia aminoacídica Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>.

Un modo preferido para obtener un análogo de péptido taquiquinina marcado radiactivamente como aquí se describe es aquel en el que el isótopo  $^{99m}\text{Tc}$  se marca con el péptido taquiquinina a través de una molécula de unión situada entre el péptido taquiquinina y el isótopo  $^{99m}\text{Tc}$ .

En este sentido, una realización se refiere a un análogo de taquiquinina marcado radiactivamente como se describe aquí en el que el isótopo  $^{99m}\text{Tc}$  se marca con el péptido taquiquinina a través de una molécula de unión situada entre el péptido taquiquinina y el isótopo  $^{99m}\text{Tc}$ .

Son ejemplos de moléculas de unión adecuadas una molécula de 1-imino-4-mercaptobutilo; una molécula de DTPA; o una molécula de 3-(p-hidroxifenil)propinilo.

El uso de DTPA y de 3-(p-hidroxifenil)propinilo como moléculas de unión se describe en Breeman y cols., J. of Nuclear Medicine, 37: 108-117 (1996). Un análogo de taquiquinina como aquí se describe puede realizarse utilizando una de estas moléculas como molécula de unión y empleando la estrategia de la sección de "Materiales y Métodos" de Breeman y cols., en combinación con el conocimiento de las personas expertas en el campo, en el que el radioisótopo  $^{111}\text{In}$  de Breeman y cols. pasa a ser el radioisótopo  $^{99m}\text{Tc}$ .

El ejemplo de trabajo 1 describe un método para obtener un análogo de  $^{99m}\text{Tc}$  - péptido SP empleando una molécula de 1-imino-4-mercaptobutilo como molécula de unión.

En este sentido, un aspecto de la invención se refiere a un método para construir un  $^{99m}\text{Tc}$  - péptido SP que comprende:

- (a) unir un 1-imino-4-mercaptobutilo a un péptido SP;
- (b) eliminar el exceso de molécula de unión por ejemplo mediante cromatografía en gel; y
- (c) marcar con  $^{99m}\text{Tc}$ .

5      Uso de una taquiquinina marcada radiactivamente

Tal y como se ha descrito anteriormente, un análogo de taquiquinina como se describe aquí puede utilizarse para la obtención de imágenes del receptor del péptido taquiquinina en mamíferos in vivo.

- 10      Preferentemente, el uso se aplica cuando el receptor de taquiquinina es un receptor de neuroquinina 1 expresado por las arteriolas y/o vénulas localizadas en la submucosa, mucosa muscular, músculo longitudinal externo y/o serosa, y en relación con esto se prefiere que el péptido taquiquinina sea un péptido sustancia P (SP) puesto que SP es el sustrato preferido para el receptor de neuroquinina 1. Ver anteriormente y P.M. van Hagen, "Somatostatin and Substance P analogues: Applications on autoimmune and haematological diseases", Thesis Erasmus, Universidad de Rotterdam (1995).
- 15      Capítulo 8.1; "Introducción").

- 20      Las realizaciones adicionales se refieren al uso tal como se ha descrito aquí, en el que el receptor de taquiquinina es un receptor neuroquinina 2, y en el que el péptido taquiquinina es un péptido de neuroquinina A; o en el
- 25      que el receptor de taquiquinina es un receptor de neuroquinina 3, y en el que el péptido taquiquinina es un péptido neuroquinina B.

Una realización de la invención se refiere al uso tal

como se ha descrito aquí, en el que la imagen in vivo del receptor de taquiquinina se obtiene in vivo en un ser humano.

Hagen y cols., European J. of Medicine, 23: 1508-1513 (1996); Hennig y cols., Int. J. Cancer 61: 786-792 (1992); Walsh y cols., Annals of the Rheumatic Diseases 51: 313-317 (1992); y Ruff y cols. Peptides 6: 107-111 (1985) describen dicha obtención de imágenes de receptor en un ser humano empleando análogos de péptido SP marcados con  $^{111}\text{In}$  o  $^{125}\text{I}$ .

10 En base a las conclusiones que se pueden extraer de estas referencias, se encuentra dentro del conocimiento general de las personas expertas el obtener in vivo imágenes del receptor de taquiquinina in vivo en un ser humano mediante el uso de un análogo de péptido taquiquinina marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  tal y como se describe aquí.

Una realización adicional se refiere al uso tal y como se describe aquí, en el que la obtención de imagen del receptor de taquiquinina in vitro se obtiene con el objetivo de medir la cantidad específica del receptor de taquiquinina presente in vivo en una célula humana.

20 Medir cantidades específicas del receptor puede ser especialmente útil para los propósitos de diagnóstico, puesto que cambios específicos en la cantidad de receptor pueden corresponderse con una enfermedad específica.

25 En relación con este aspecto, se prefiere que la célula humana sea una célula humana seleccionada del grupo consistente en una célula tumoral, un linfocito T, una célula de timo, una célula de neoplasma, un monocito y un mastoci-

to.

Estas células se conoce que expresan en particular el receptor de neuroquinina 1 (Hagen y cols., European J. of Medicine, 23: 1508-1513 (1996); Hennig y cols., Int. J. Cancer 61: 786-792 (1992); Walsh y cols., Annals of the Rheumatic Diseases 51: 313-317 (1992); y Ruff y cols. Peptides 6: 107-111 (1985)).

En este sentido, en relación con estas células humanas específicas, se prefiere que el receptor de taquiquinina sea un receptor de neuroquinina 1 y el péptido taquiquinina es un péptido sustancia P (SP).

Las realizaciones finales se refieren al uso tal y como se describe aquí, en el que el propósito de la obtención de imágenes del receptor de péptido taquiquinina es un objetivo diagnóstico, y en particular cuando el objetivo de diagnóstico se refiere a un diagnóstico de inflamación o un diagnóstico de un tumor.

Resulta evidente a partir de las referencias citadas anteriormente que un análogo de péptido taquiquinina de mamífero marcado radiativamente es muy útil para dichos propósitos de diagnóstico, en particular puesto que proporciona la posibilidad de medir una cantidad específica de un receptor de taquiquinina situado in vivo en una célula humana.

## Ejemplos

### Ejemplo 1:

Preparación de un péptido SP marcado con un isótopo de  $^{99m}\text{Tc}$  empleando una molécula de 1-imino-4-mercaptobutilo como

5 molécula de unión:

Todos los ingredientes esenciales empleados en este ejemplo están disponibles comercialmente.

Se preparó un Tc-99m-SP de alta actividad específica empleando un grupo 1-imino-mercaptobutilo unido entre Tc-  
10 99m reducido y SP. Una formulación de 30 nmol de SP, 1  $\mu\text{mol}$  de 2-iminotiolano (2-IT) y 22  $\mu\text{mol}$  de  $\text{SnCl}_2$  tuvo como resultado una eficiencia de marcaje de Tc-99m-SP de más del 90% y fue estable durante 6 horas. Antes del marcaje con Tc-99m, el exceso de molécula de unión no reaccionada se eliminó del SP modificado por cromatografía en gel, y los via-  
15 les de reacción se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$ . Se disoció un 64,7  $\pm$  5,9% de Tc-99m de la molécula marcada tras 1 hora de incubación de SP marcado con Tc-99m con un exceso molar 500:1 de cisteína.

20 Este método de derivación de 2-IT es sencillo, eficaz y adecuado para una formulación para la preparación de análogos de SP marcados con Tc-99m.

Ejemplo 2

Unión / captación específica de Tc-99m-SP en las glándulas salivares de un ratón

Ratones: ratones de laboratorio disponibles comercialmente

5

Biodistribución a 90 minutos de Tc-99m-SP en ratones como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g). Los valores son medias (%ID/g) y errores estándar de la media.

10

Sangre	Bazo	Hígado	Pulmón	Riñón
2,2 ± 0,1	7,5 ± 1,2	15,2 ± 1,8	2,4 ± 0,4	10,1 ± 1,5

15

Captación a 90 minutos de Tc-99m-SP en glándulas salivares de ratones como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de órgano (%ID/g) antes y después de la administración de SP no radiactivo. Los valores son medias (%ID/g) y error estándar de la media.

Control	90 nmol SP	Captación específica
1,60 ± 0,05	0,98 ± 0,05	0,62

## REIVINDICACIONES

1. Un análogo de péptido taquiquinina de mamífero marcado radiactivamente que comprende un péptido taquiquinina marcado con un isótopo  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}$  - péptido taquiquinina) y que presenta una semivida in vivo de al menos 30 minutos, preferentemente una semivida in vivo de al menos 1 hora, más preferentemente una semivida in vivo de al menos 3 horas, y con mayor preferencia una semivida in vivo de al menos 5 horas.
- 10 2. El análogo de péptido taquiquinina de la reivindicación 1, en el que el péptido taquiquinina se selecciona del grupo consistente en: un péptido neuroquinina A; un péptido neuroquinina B; un neuropéptido K (una forma extendida en N terminal a partir de neuroquinina A); un neuro-  
15 péptido Y (una forma extendida en N terminal de neuroquinina A); y preferentemente un péptido sustancia P (SP).
3. El análogo de taquiquinina de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el análogo es capaz de realizar una unión específica en las glándulas salivares de ratón en al menos  
20 un 0,35% de la dosis inyectada por gramo de órgano (%ID/g), expresado como la diferencia de captación tisular (captación de 90 minutos) entre ratones no tratados y ratones tratados con 90 nmol de un péptido taquiquinina no radiactivo.
- 25 4. El análogo de taquiquinina de la reivindicación 3, en el que el análogo es capaz de realizar una unión específica en las glándulas salivares de ratón en al menos un 0,45% de la dosis inyectada por gramo de órgano (%ID/g);



más preferentemente en el que el análogo es capaz de unirse específicamente a las glándulas salivares de un ratón en al menos un 0,55% de la dosis inyectada por gramo de órgano (%ID/g).

5            5. El análogo de taquiquinina de las reivindicaciones 3 ó 4, en el que el péptido taquiquinina es péptido sustancia P (SP).

6. El análogo de péptido taquiquinina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el péptido taquiquinina comprende la secuencia aminoacídica C terminal  
10            -Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, donde X representa Phe, Ile o Val.

7. El análogo de péptido taquiquinina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el péptido taquiquinina es un péptido sustancia P (SP) que consiste esencialmente en la secuencia aminoacídica Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-  
15            Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>.

8. El análogo de taquiquinina marcado radiactivamente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el isótopo <sup>99m</sup>Tc está unido al péptido taquiquinina a través de  
20            una molécula de engarce situada entre el péptido taquiquinina y el isótopo <sup>99m</sup>Tc.

9. El análogo de taquiquinina marcado radiactivamente de la reivindicación 8, en el que la molécula de unión es una molécula de 1-imino-4-mercaptobutilo.

25            10. El análogo de taquiquinina marcado radiactivamente de la reivindicación 8, en el que la molécula de unión es una molécula de DTPA.

11. El análogo de taquiquinina marcado radiactivamente

de la reivindicación 8, en el que la molécula de unión es una molécula de 3-(p-hidroxifenil)propinilo.

12. El uso de un análogo de taquiquinina marcado radiactivamente de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5 11 para la obtención de imágenes in vivo del receptor de péptido taquiquinina de mamífero.

13. El uso de la reivindicación 12, en el que el receptor de taquiquinina es un receptor de neuroquinina 1 expresado por arteriolas y/o vénulas localizadas en la sub- 10 mucosa, mucosa muscular, músculo longitudinal externo y/o serosa.

14. El uso de la reivindicación 13, en el que el péptido taquiquinina es un péptido sustancia P (SP).

15. El uso de la reivindicación 12, en el que el receptor de taquiquinina es un receptor de neuroquinina 2 y en el que el péptido taquiquinina es un péptido neuroquinina A.

16. El uso de la reivindicación 12, en el que el receptor taquiquinina es un receptor neuroquinina 3 y en el 20 que el péptido taquiquinina es un péptido neuroquinina B.

17. El uso de cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 16, en el que la obtención de imágenes del receptor de taquiquinina in vivo se realiza in vivo en un ser humano.

18. El uso de la reivindicación 17, en el que la obtención de imágenes del receptor de taquiquinina in vivo se 25 realiza para medir una cantidad específica de receptor taquiquinina situada in vivo sobre una célula humana.

19. El uso de la reivindicación 18, en el que la célula

la humana es una célula humana seleccionada del grupo consistente en una célula tumoral, un linfocito T, una célula de timo, una célula de neoplasma, un monocito y un mastocito.

5        20. El uso de la reivindicación 19, en el que el receptor de taquiquinina es un receptor de neuroquinina 1 y en el que el péptido taquiquinina es un péptido sustancia P (SP).

10       21. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 12-20, en el que el propósito de la obtención de imágenes del receptor de taquiquinina es un propósito de diagnóstico.

22. El uso de la reivindicación 21, en el que el propósito diagnóstico es un diagnóstico relacionado con una inflamación o un diagnóstico relacionado con un tumor.


15       23. Un kit de diagnóstico que comprende un análogo de taquiquinina marcado radiactivamente de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11 y que es adecuado para ser utilizado en cualquiera de los usos de las reivindicaciones 12 a 22.

Madrid, a 5 de Julio de 1.999

D. PEDRO ORTIZ ARMUA

p.p.

NURIA ISERN



THIS PAGE BLANK (USPTO)